

백서에서 포르말린 피하주사에 의한 척수후각신경세포의 발화 생성에 Glutamate 수용체와 GABA 수용체의 역할

연세대학교 의과대학 생리학교실, *마취통증의학교실

배정운 · 장준호 · 전영훈 · 윤덕미* · 임중우 · 남택상 · 백광세

= Abstract =

A Role of Glutamate and GABA Receptors in the Generation of Formalin-induced Impulse Firing of Spinal Dorsal Horn Neurons in the Rat

Jung Yoon Bae, M.S., Jun Ho Jang, M.S., Young Hoon Jeon, Duck Mi Yoon, M.D.*,
Joong Woo Leem, Ph.D., Taick Sang Nam, M.D., and Kwang Se Paik, M.D.

Departments of Physiology and of *Anesthesiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: A peripheral subcutaneous injection of formalin produces biphasic impulse firing of the spinal nociceptive neurons. The roles of excitatory glutamatergic and inhibitory GABAergic receptors were investigated in the formalin-induced impulse generation of rat spinal neurons.

Methods: The neuronal activity was recorded, extracellularly, from the spinal nociceptive neurons of rats spinalized at L1. Formalin (2.5%, 50μl) was injected into the plantar spot near the receptive field of the recorded neuron. Agonists and antagonists, for glutamatergic and GABAergic receptors, were applied topically onto the surface of the spinal cord near the recording electrode.

Results: The plantar injection of formalin evoked typical biphasic firing of the spinal neurons. When applied before the formalin injection, AMPA receptor antagonists blocked the first firing, while the receptor antagonist, NMDA and mGlu, blocked the second firing. When applied before the formalin injection, or during the interphase, receptor antagonists, GABA-A and GABA-B, facilitated the second firing to occur. When applied during the second firing, the receptor antagonists, NMDA, AMPA and mGlu, all blocked the second firing, while the receptor antagonists, GABA-A and GABA-B, had no effect.

Conclusions: The results indicated that: 1) the formalin-produced first firing is mediated by AMPA receptor activation, 2) the first firing is followed by GABAergic inhibition, which contributes to the formation of the interphase, via activation of GABA-A and GABA-B receptors, and 3) the induction of the second firing is mediated by the diminution of GABAergic inhibition, as well as the activation of the NMDA and mGlu receptors, while being mediated in its maintenance by the activation of NMDA, AMPA and mGlu receptors.

Key Words: Formalin, GABA, Glutamate, Inflammation, Pain

책임저자 : 임중우, 서울시 서대문구 신촌동 132, 연세의대 생리학교실, 우편번호: 120-752

Tel: 02-361-5195, Fax: 02-393-0203, E-mail: jwleem@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: 02-PJ1-PG3-21302-0014).

서 론

실험동물의 뒷발 피부에 포르말린(2.5%)을 피하 주입하여 행동학적 통증 반응을 관찰하는 포르말린 테스트(formalin test)는 백서와 마우스를 이용한 실험에서 주로 사용되어 왔으며, 조직의 손상을 야기하여 지속적 통증을 유도하는 것으로 알려졌다.¹⁻⁴⁾ 백서의 뒷발 피부에 acetic acid, carrageenan, formalin, kaolin, mustard oil 등의 자극물질을 주입한 뒤 자발적 통증 반응으로 간주 할 수 있는 행동인 움찔함과 흔들(flinching/shaking) 그리고 핥음과 깨물(licking/biting) 등의 행동을 관찰한 결과, formalin과 acetic acid 만 이들 통증 행동이 격렬히 오래 동안 유지되며 특히 포르말린에 의해 유도되는 움찔거리며 꿈꾸니를 빼려는 듯한 행동인 움찔함 반응에는 즉각적인 것과 뒤 늦게 천천히 나타나는 것이 함께 포함되어 있음이 보고됨으로써, 포르말린 테스트는 급성통증 및 만성통증을 동시에 연구하기 위한 통증 모델로써 제시되었다.¹⁻⁴⁾

포르말린 피하주사에 의해 두 차례에 걸쳐 생성되는 반응은 주사 후 50-70분에 걸쳐 나타나는데, 그 시간대별 진행과정에는 주입 후 즉각적으로 생성되어 약 5분간 유지되는 일차 통증 반응, 그 이후 10-20분에 걸쳐 통증반응이 억압되는 중간기, 그리고 다시 생성되어 35-40분에 걸쳐 유지되는 이차 통증반응이 포함된다. 이 중 특히 이차 통증반응은 외부로부터의 자극이 없음에도 불구하고 자발적으로 서서히 증가하여 비교적 오래 지속되기 때문에, 인체에서 발생하는 지속적 통증의 발생 기전을 조사하기 위한 모델로 자주 이용되어져 왔다.

포르말린 주사에 의해 유발되는 통증반응에 관한 행동학적 연구에서 aspirin과 hydrocortisone 등의 항염증 제제의 투여가 이차 통증반응에는 진통 효과를 일으키는 반면, 일차 통증반응에는 영향을 미치지 않음이 관찰됨으로써⁵⁾ 이들 일차 및 이차 통증반응이 염증과정에 의해 서로 다르게 영향 받는다고 추정되었다. 이후 흥분성 아미노산에 대한 연구에서 글루타민산(glutamate) 및 아스파틴산(aspartate)이 포르말린 유도 이차 통증반응을 현저히 증가시킨다고 보고됨으로써⁶⁾ 흥분성 체계를 구성하는 신경전달물질들이 이차 통증반응에 기여할 수 있음이 시사되었다.

이들 흥분성 아미노산의 효과는 척수 내 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 활성화를 통해 이루어진다고 많은 행동 연구를 통해 이미 잘 알려져 있다.⁷⁾ 말초 신경의 손상 후 유발되는 신경병증성 통증의 경우에 그 유도(induction)와 유지(maintenance)에 기여하는 글루타민산 수용체 각 아형들의 역할이 상이함이 보고되었음을 볼 때, 포르말린에 의한 통증반응의 유도와 유지에 NMDA 수용체 이외의 글루타민산 수용체 아형의 작용이 시간적으로 다르게 관여할 수 있음이 추정되나 구체적으로 밝혀진 바 없다.

포르말린 주입 후 생성되는 두 차례의 통증반응 중간에 관찰되는 중간기의 형성은 단지 일차 반응을 매개하는 척수 내 흥분작용의 소실에 의함이 아니라, 척수 내 억제성 체계의 활성화에 따른 능동적인 억제에 의해 이루어질 가능성이 제시되었다. 이는 포르말린 주입 후 생성되는 일차 통증반응에 뒤이어 형성되는 중간기 동안에 포르말린을 첫 번째 주입했던 부위에 재 주입할 경우 첫 번째 주입에 의해 생성되는 이차 통증반응이 억제됨을 관찰한 실험결과에 의해 간접적으로 뒷받침되었으나,⁸⁾ 직접적인 실험 근거는 없는 실정이다. 특히 척수 내 통증정보 전달과정이 흥분성 체계의 단독적인 작용 결과라기 보다는 억제성 체계와의 상호 역동적인 균형에 의해 조절된다는 보고는,⁹⁻¹³⁾ 억제성 체계의 참여로 유지되던 균형 상태가 깨어질 때 병리적 통증이 야기될 수 있음을 시사한다. 이러한 측면에서 포르말린 주입에 의해 관찰되는 중간기의 형성에 있어서 포유류 중추신경계 내 전체 억제성 기능의 약 40%를 담당하는 GABA 체계의 역할에 관한 조사는 매우 흥미로운 연구 대상이며 이에 관한 연구가 필요하다.

포르말린 주입에 의해 생성되는 두 가지 통증반응은 주로 행동학적인 측정에 의해 조사되어져 왔다.¹⁻⁴⁾ 이들 통증반응은 시간적인 진행과정에 있어서 포르말린 주입 후 척수 내 통각정보전달 신경에서 생성되는 신경발화 양상과 일치함이 전기생리학 실험을 통하여 관찰된 바 있다.⁸⁾ 이는 포르말린 주입에 의한 척수 내 신경세포의 신경발화의 생성 기전에 관한 조사를 통하여 포르말린 유도 통증반응의 기전을 유추할 수 있음을 의미한다. 그러나 신경활동 기록을 통한 연구는 통각정보전달 과정을 단일신경세포 수준에서 독립적으로 관찰할 수 있다는 이점에도 불구하고, 단일신경세포의 신경활동 분리 및

장시간에 걸친 신경활동 기록 등에 관한 기술적인 어려움으로 인해 쉽게 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 또한 척수 내 신경세포는 척수 상위 부위로부터 여러 종류의 하행성 신경로의 영향을^{14,15)} 받는 것으로 알려져 있는데, 이러한 영향을 척수의 특정 부위에서 절단해 줌으로써 배제할 수 있다는 점도 행동학적 연구에서는 실행하기 어려운 점이다.

본 연구는 척수 절단(L1 절단)한 백서를 이용하여, 뒷발에 포르말린 피하주사 후 척수(L5) 내 통각정보 전달 신경세포로부터 관찰되는 두 반응기 및 중간기의 생성에 있어서 척수 내 흥분성 및 억제성체계의 역할을 조사하기 위하여 실시하였다.

대상 및 방법

행동학적 관찰

행동학적 관찰을 위한 실험에는 연세대학교 의과대학 실험 동물부에서 사육한 백서(Sprague-Dawley, 250–300 g) 6마리를 사용하였다. 실험동물의 좌측 뒷발바닥에 2.5% 포르말린 희석 용액(50 μ l)을 주사한 뒤, 격자철망(0.5 cm의 격자간격) 위에 올려 둔 투명한 아크릴 상자(8 × 8 × 24 cm³의 크기) 내부에 위치시켜 포르말린 주입 측 뒷발에서 나타나는 통증 행동인 움찔함(flinching) 반응의 회수를 5분 단위로 기록하였다. 말초 포르말린 주입에 의해 특징적으로 나타나는 움찔함 반응은, 포르말린을 투여한 뒷발 또는 양측 발의 반사적인(reflexive) 오므림(retraction) 또는 흔들(shaking)으로 관찰된다. 포르말린 투여 후 매 5분 단위 동안 발현되는 움찔함 반응의 총 회수를 기록하여 그래프로 제시하였다.

전기생리실험을 위한 동물 준비

전기생리학적 세포 기록을 위한 실험동물은 30% urethane (5 mg/kg)을 복강에 주사하여 마취하며 실험 도중에 동물이 깰 경우 추가로 주사하였다. 척수 후각에서의 세포 기록을 위해서는 등쪽 털을 면도한 후 T13-L3 척수 수준에서 후궁절제술(laminectomy)를 시행하여 요추부 팽대(lumbar enlargement)를 드러내었다. 시술 후 동물은 귀고정장치(ear bar)와 척수고정장치(spinal clamp)를 이용하여 뇌척수정위장치에 고정시키고 등쪽 피부를 펼쳐 외부 고정대에 잡아매어 풀(pool)을 형성한 뒤 척수 건조 방지를 위해 미

네랄오일로 채웠고, 이후 경질막과 연질막을 제거하였다. 전 실험 기간동안 동물의 안정된 체온의 유지를 위해 직장 온도를 감지하였으며, 열담요와 열전구를 사용하여 36–37°C의 체온을 유지하였다.

신경활동의 전기적 기록과 데이터 수집

탄소전극(carbon electrode, 2–4 M Ω at 1 kHz)을 사용하여 L3–L5 척수 수준에서 척수 표면으로부터 150–300 μ m 깊이의 척수후각에 존재하는 신경세포의 단일신경활동을 기록하였다. 전극에 의해 탐지된 신경활동은 신호확장기(DAM-80, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)로 10,000배 증폭한 다음 오실로스코프 화면상에 나타내었다. 증폭된 여러 크기의 신경활동 신호로부터 분별기(window discriminator, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 동일한 크기를 가진 단일 신호를 분리하였으며, 단위 시간당 발생하는 단일 신경활동 신호의 개수는 전기생리자료수집계(1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK)를 이용하여 컴퓨터 모니터 상에서 기록하였다.

척수후각 신경세포의 기계자극에 대한 반응도 측정

척수 내 후각신경세포의 단일 신경활동을 기록한 후 발 피부에 존재하는 체감각 수용장에 기계적 자극(mechanical stimuli)을 가해 주면서 반응도를 조사하였다. 이때 사용한 기계적 자극으로는 세 종류가 이용되었는데, 즉 체감각 수용장 중심을 붓으로 긁어가며 자극하거나(brush), 큰 동맥용집게로 집거나(약 100 g의 힘 발휘, press), 또는 작은 동맥용집게로 집는(약 400 g의 힘 발휘, pinch) 자극이었다. 각 자극을 실험자의 손등 피부에 가해 주었을 때 가벼운 촉각, 압각, 또는 통각으로 인식되었다. 이들 세 가지 자극에 대한 반응 양상을 조사하여 신경세포를 기능적으로 분류하는데 이용하였다.

포르말린 주입

단일 신경세포 활동이 안정되게 유지되는 것을 확인하고, 5분 동안에 걸쳐 기초 활동(basal activity)을 기록한 다음, 실험동물의 뒷발 체감각 수용장에 주사기(30 gauge)를 이용하여 포르말린 용액(2.5%, 50 μ l)을 피하 주입하였다. 포르말린 주사는 약 2분 정도

에 걸쳐 천천히 수행하였다.

약물 투여

실험에 사용한 약물로는 glutamate 수용체 및 γ -aminobutyric acid 수용체 아형들에 대한 효현제나 길항제가 포함되었는데, 이들은 기록전극 근처의 척수 표면에 국소적으로 가해 주었다. Ionotropic glutamate 수용체에 대하여는 AMPA와 NMDA 수용체 각각의 길항제인 NBQX disodium salt와 (+)-MK-801 maleate, 그리고 metabotropic glutamate 수용체의 길항제로는 (RS) MCPG를 사용하였다. GABA-A 수용체의 효현제와 길항제로는 각각 muscimol과 bicuculline methiodide을, 그리고 GABA-B 수용체의 효현제와 길항제로는 각각 (RS) baclofen과 phaclofen을 사용하였다. 이들 약물은 모두 Tocris 회사(Cookson Inc, Ballwin, MO, USA)로부터 구입하였으며, (RS) MCPG를 제외한 모든 약물은 생리식염수로 녹여 사용하였다. (RS) MCPG는 0.6 mg을 5 μ l NaOH (1 M)에 녹이고 여기에 생리식염수를 첨가하여 1 ml를 만들었다. 따라서 대조군 자료를 얻기 위해 투여한 vehicle로서 (RS) MCPG의 경우는 5 μ l NaOH와 995 μ l 생리식염수의 혼합물을 그리고 나머지 약물의 경우는 생리식염수를 사용하였다. 각 약물과 vehicle은 50 μ l씩 투여하였다. 약물과 vehicle의 투여 시점으로서 세 경우를 택하였다. 즉, 포르말린 주입을 기점으로 주입 5분 전(전처치), 주입 8분 후(일차발화반응이 끝나고 중간기가 시작된 뒤 2-3분 경과 시), 그리고 주입 34분 후(일차발화반응이 시작된 뒤 10여분 경과 시)이다. 투여한 약물의 농도에 있어서 glutamate 수용체의 길항제 경우는 0.03 mg을 그리고 GABA 수용체의 길항제와 효현제 경우는 0.3 μ g 사용하였는데, 그 이유는 이들 농도를 통증모델 백서에 지주막하강 내로 투여 했을 시 가장 효과적으로 통증반응에 영향을 미침을 관찰한 바 있었기 때문이다.

자료 분석

신경세포에서 발화하는 활동전위는 1분 동안에 발화하는 신경임펄스의 총 회수를 합산하여 분당 발화 임펄스 수로서 측정하였는데, 이는 여러 세포로부터 얻어 평균값으로 계산하였으며 그 값들은 표준오차와 함께 그래프로 나타내었다. 이러한 자료는 각 신경세포로부터 70-90분 정도에 걸친 기록 기간 동안

얻어서 실험군과 대조군을 비교하였다. 각 시점에서 두 군의 평균값 간의 차이 비교는 Mann-Whitney rank-sum test를 이용하여 결정하였다. P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의미한 차이가 있다고 간주하였다.

결 과

포르말린 주사에 의해 유도된 이상성(biphasic) 반응에 관한 행동학적 및 전기생리학실험 결과의 비교

백서의 뒷발 피부에 포르말린을 피하주사 하였을 때 유도되는 통증반응(Fig. 1A)과 동일 방법에 의해 백서의 척수후각 내 신경세포에서 기록된 신경발화(Fig. 1B)를 조사하였다. 이들 행동학적 반응과 전기생리학적 발화 반응은 모두 비슷한 양상으로 두 차례에 걸친 이상성반응(biphasic response)을 보였다. 이러한 이상성반응은 포르말린 주사 후 약 5분 동안에 걸쳐 첫 번째 반응이 생성되고 그 후 5-10분간에 걸쳐 반응이 사라지는 중간기를 거치고 그 후 약 40-50분간에 걸쳐 두 번째 반응이 생성됨이 특징적으로 관찰되었다.

척수 후각 내 신경세포에서 보이는 수용장의 기계자극에 대한 반응도와 포르말린 주사에 대한 발화반응

척수후각(L3-5) 내 신경세포의 수용장에 가해진 세 가지 기계자극인 brush, press, 그리고 pinch자극에 대한 반응도를 조사하였고, 반응도 특성에 따라 후각신경세포를 세 종류로 분류하였다. 즉 첫째는 약한 강도의 brush자극에 가장 반응을 잘 보이는 저역치(low threshold, LT)형이고 둘째는 세 종류 자극에 모두 반응을 하되 자극이 강할수록 이에 비례하여 반응의 정도가 점차적으로 증가함을 보이는 광동적 범위(wide dynamic range, WDR)형 그리고 셋째는 강한 강도의 자극에만 반응을 보이는 고역치(high threshold, HT)형의 신경세포로서 이들의 전형적인 반응도를 Fig. 2(A, B, C)에 나타내었다. 이들 세 종류의 후각신경세포 각각에 관해서 말초 수용장에 주사해 준 포르말린에 의해 유발되는 신경발화의 특성을 조사하였으며 그 결과를 Fig. 2 (D, E, F)에 나타내었다. 포르말린 주입에 의한 이상성 발화반응은 저역

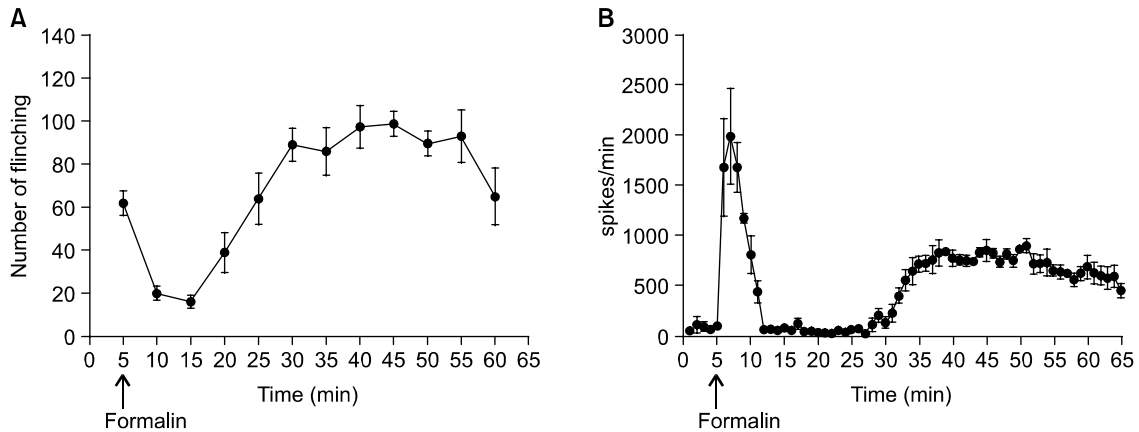


Fig. 1. Time courses of pain behavior and impulse firing of spinal nociceptive neurons following subcutaneous injection of formalin into the sole of the hindpaw. A: the number of flinching over 5 minutes for individual animals was counted and averaged to represent as an index of pain behavior ($n = 6$). B: the number of impulse firing generated every minute for individual spinal neurons was counted and averaged to represent as the extent of impulse firing ($n = 5$). Error bars represent the mean \pm SEM.

치형을 제외한 고역치형 및 광동적범위형의 후각신 경세포에서 관찰하였다.

포르말린 주사에 의한 척수 후각신경세포의 이상성 발화반응에 있어서 척수 표면에 가해진 glutamate 수용체 길항제가 미치는 영향

광동적범위 또는 고역치형 척수 후각신경세포의 신경활동을 대상으로, glutamate 수용체 길항제인 MK-801 (0.03 mg, NMDA 수용체 길항제), NBQX (0.03 mg, AMPA 수용체 길항제), 또는 MCPG (0.03 mg, metabotropic glutamate 수용체 길항제)를 기록전극 주변의 척수표면에 포르말린 주사 전에 적용하거나 포르말린 주사에 의해 유발된 이차 신경발화 도중에 적용하고 그 효과를 조사하였다.

포르말린 주사 전 처치한 glutamate 수용체 길항제의 효과: 각 glutamate 수용체 길항제나 vehicle을 포르말린 주사 전에 적용한 경우 간을 비교하였다(Fig. 3). MK-801과 MCPG의 적용은 대조군의 경우와 비교하여 포르말린 주사에 의한 이차 발화반응을 통계적으로 의미 있게 억제하였다($P < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test). 한편 NBQX의 적용은 대조군의 경우와 비교하여 포르말린 주사에 의한 발화반응에 영향을 미치지 않았다.

포르말린 주사 후 생성된 이차 발화 도중 처치한 glutamate 수용체 길항제의 효과: 각 glutamate 수용체 길항제나 vehicle을 포르말린 주사 후 생성되는 이차 신경발화 도중에 적용한 경우 간을 비교하였다(Fig. 4). MK-801, NBQX, 그리고 MCPG의 적용 모두는 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응을 통계적으로 의미 있게 억제하였다($P < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test).

포르말린 주사에 의한 척수 후각신경세포의 이상성 발화반응에 있어서 포르말린 주사 이전 및 이차 발화 이전(즉, 중간기 도중) 척수 표면에 가해진 GABA 수용체 길항제가 미치는 영향

광동적범위 또는 고역치형 척수 후각신경세포의 신경활동을 대상으로, GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline (0.3 μ g) 또는 GABA-B 수용체 길항제인 phaclofen (0.3 μ g)을 기록전극 주변의 척수표면에 포르말린 주사 전에 적용하거나 포르말린 주사에 의해 유발된 일차 신경발화 소멸 후 중간기 도중에 적용하고 그 효과를 조사하였다.

포르말린 주사 전 GABA 수용체 길항제 처치의 효과: GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline이나 GABA-B 수용체 길항제인 phaclofen을 기록전극이 위치하는 척수표면에 적용한 후 포르말린 주사에 의

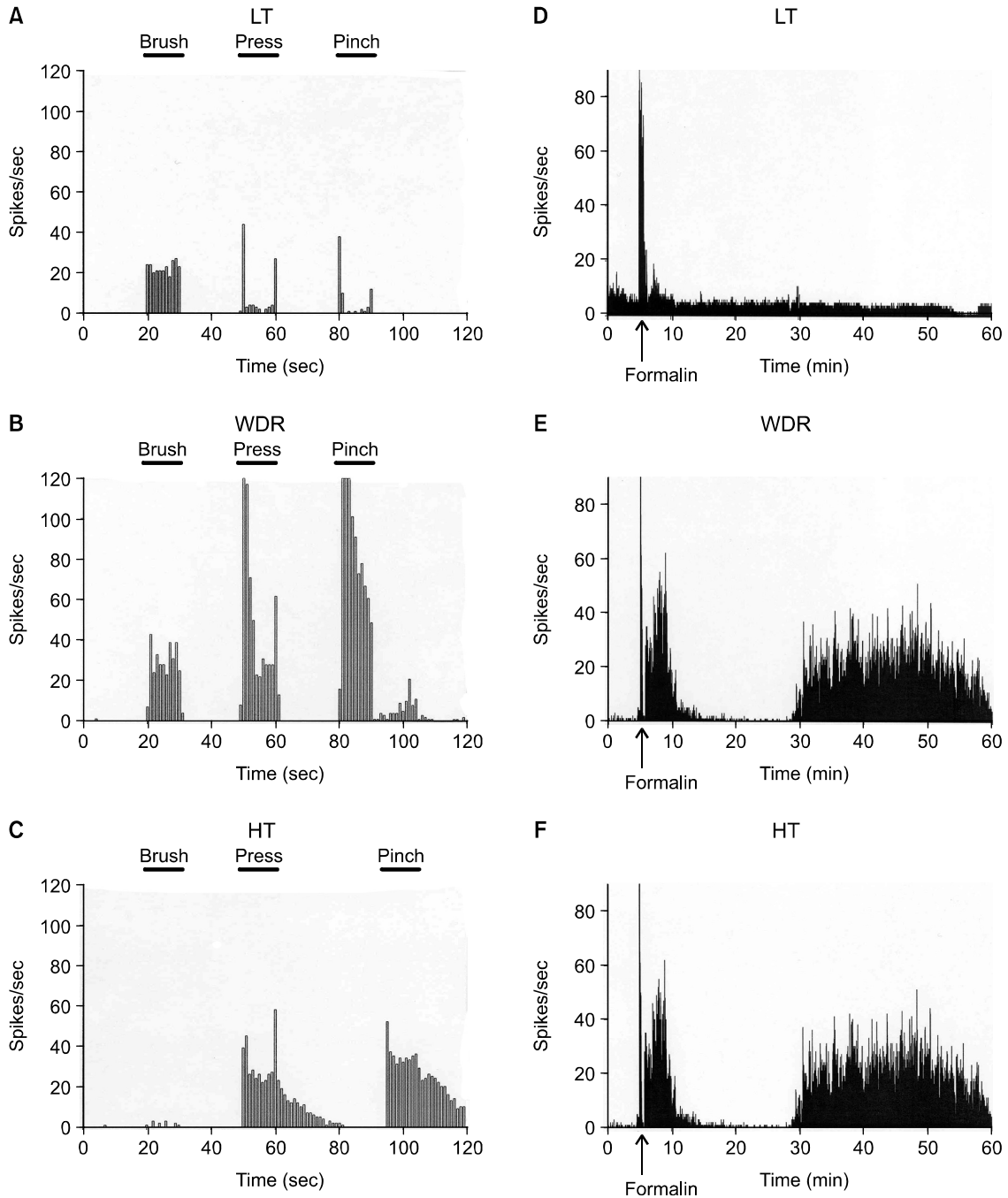


Fig. 2. Mechanical responsiveness and formalin-induced impulse firing of spinal dorsal horn neurons. In the left column, three types of dorsal horn neurons showed different patterns of responses to three mechanical stimuli (brush, press and pinch) applied to somatic receptive field on the hindpaw (A, B, C). For each type of dorsal horn neuron, impulse firing induced by formalin injection was shown in the right column at the corresponding row (D, E, F).

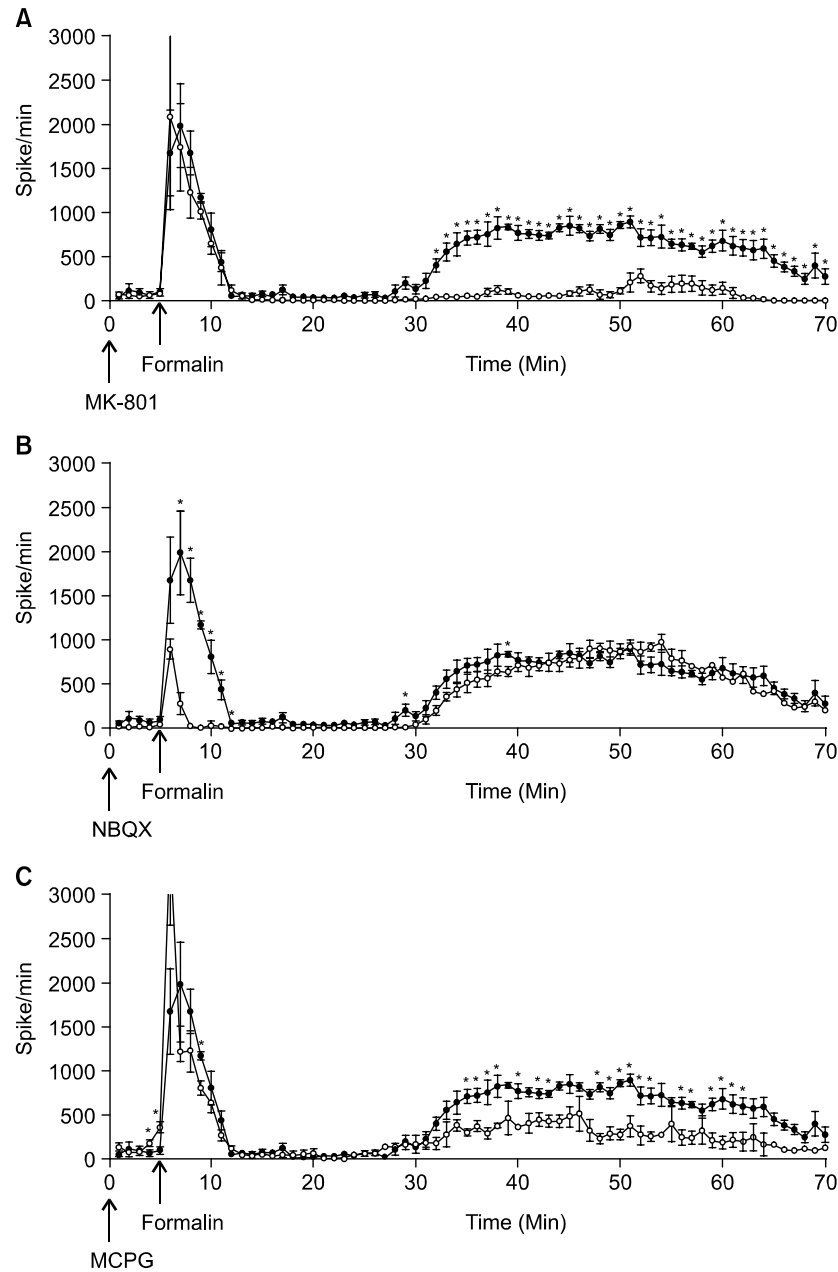


Fig. 3. Effects of pre-treated glutamate receptor antagonists on the formalin-induced biphasic firing response. MK-801 (A), NBQX (B) or MCPG (C) was applied (0.03 mg each) topically onto the surface of the spinal cord near the recording site at 5 minutes before formalin injection. In each graph, averaged numbers of impulse firings generated every minute for sampled neurons (A, $n = 3$; B, $n = 5$; C, $n = 3$) were plotted against time. For a comparison, data obtained from control groups (closed symbols, applied with vehicles, $n = 5$) were depicted together in each graph with experimental data (open symbols). Error bars represent the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared drug-treated group with control group at each time point as determined by Mann-Whitney rank sum test.

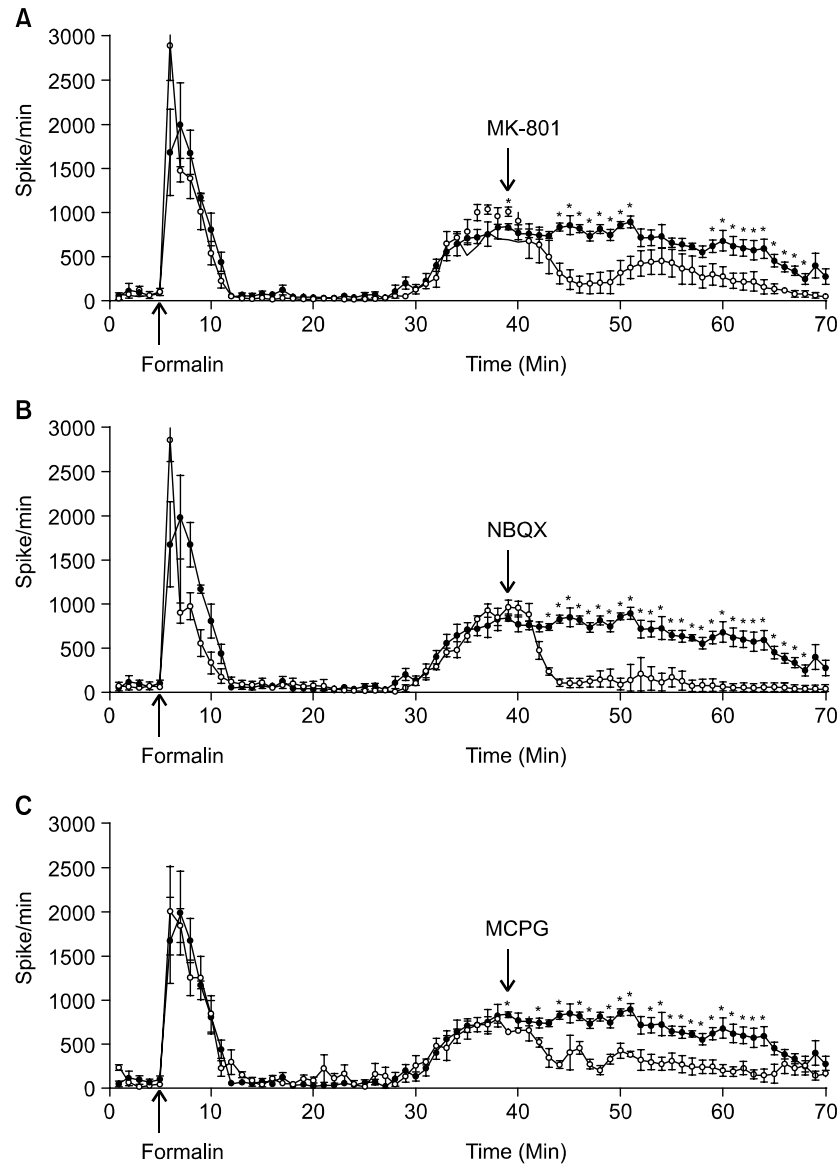


Fig. 4. Effects of glutamate receptor antagonists treated during the second phase on the formalin-induced biphasic firing response. MK-801 (A), NBQX (B) or MCPG (C) was applied (0.03 mg each) topically onto the surface of the spinal cord near the recording site during the second phase of the formalin-induced biphasic firing. In each graph, experimental data (A, $n = 6$; B, $n = 5$; C, $n = 3$), were depicted with control data same as in Fig. 3. For other explanation, refer to Fig. 3.

해 생성된 발화반응과 vehicle을 척수표면에 적용한 후 포르말린 주사에 의해 생성된 발화반응을 비교하였다(Fig. 5). 길항제인 bicuculline의 전처치는 대조군의 경우와 비교하여 일차 발화반응에는 영향 없이,

이차 발화반응의 유도를 촉진함으로써 중간기의 소멸을 야기하였다. 한편 동일한 실험을 GABA-B 수용체 길항제인 phaclofen을 이용하여 실시한 결과, GABA-A 수용체 길항제의 효과와 동일한 결과를 관

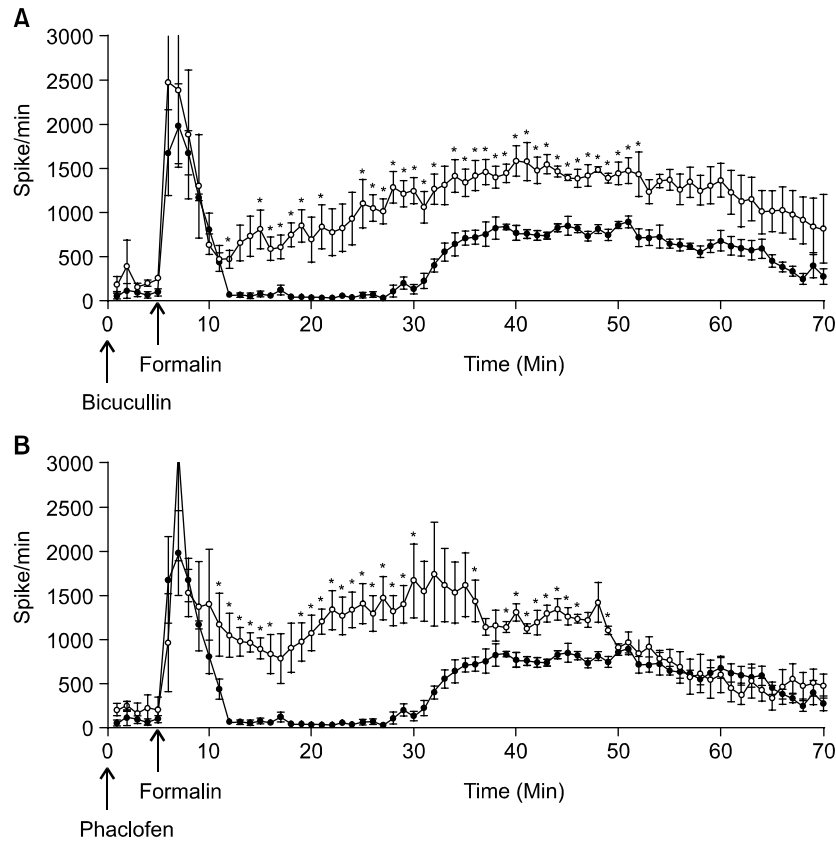


Fig. 5. Effects of pre-treated GABA-A receptor or GABA-B receptor antagonist on the formalin-induced biphasic firing response. GABA-A antagonist bicuculline (A) or GABA-B antagonist phaclofen (A) was applied ($0.3\mu\text{g}$ each) topically onto the surface of the spinal cord near the recording site at 5 minutes before formalin injection. In each graph, experimental data (A, $n = 4$; B, $n = 4$), were depicted together with control data same as in Fig. 3. For other explanation, refer to Fig. 3.

찰하였다. 즉, 길항제인 phaclofen ($0.3\mu\text{g}$)의 전처치군은 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응의 유도를 촉진함으로써 중간기의 소멸을 야기하였다(즉, 중간기와 이차반응기 모두에서 신경발화가 통계적으로 의미 있게 항진됨을 보임, $P < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test). 이들 약물은 모두 일차 발화반응에는 거의 영향을 미치지 않았다.

포르말린 주사 후 중간기 도중 처치한 GABA 수용체 길항제의 효과: 앞의 실험과 유사한 실험을 포르말린 주사에 의한 일차 발화반응이 소멸된 직후 즉 중간기 초기에 약물을 적용해 주고 그 효과를 조사하였다. 말초 수용체에 포르말린을 주사하여 일차 발화반응이 생성되고 소멸한 후에 GABA-A 수용체

길항제인 bicuculline이나 GABA-B 수용체 길항제인 phaclofen을 기록전극이 위치하는 척수표면에 적용해 준 뒤 발화 양상과 vehicle을 척수표면에 적용해 준 뒤 발화 양상을 비교하였다(Fig. 6). 길항제인 bicuculline의 처치는 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응의 유도를 촉진함으로써 중간기의 소멸을 야기하였다. 동일한 실험을 GABA-B 수용체 길항제인 phaclofen을 이용하여 실시한 결과, GABA-A 수용체 길항제의 효과와 동일함을 관찰하였다. 즉, 길항제인 phaclofen ($0.3\mu\text{g}$)의 약물 처치군은 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응의 유도를 촉진함으로써 중간기의 소멸을 야기하였다(즉, 약물을 가해진 시점으로부터 특히 중간기 동안의 신경발화가 통계적으

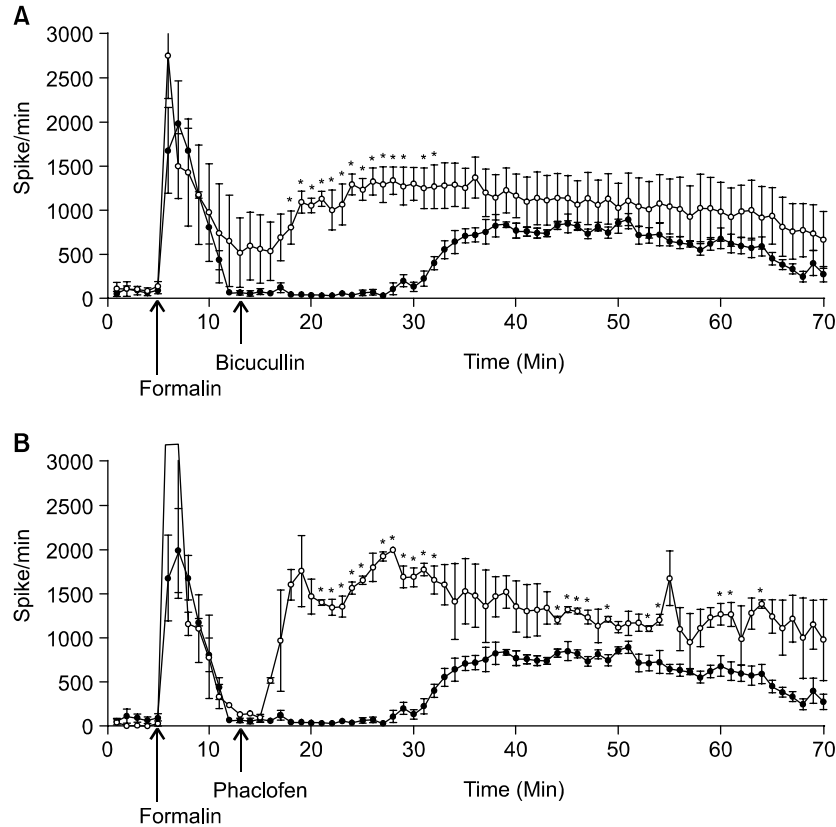


Fig. 6. Effects of GABA-A receptor or GABA-B receptor antagonist treated during the interphase on the formalin-induced biphasic firing response. GABA-A antagonist bicuculline (A) or GABA-B antagonist phaclofen (B) was applied (0.3 μ g each) topically onto the surface of the spinal cord near the recording site after ceasing the first phase of firing. In each graph, experimental data (A, n = 4; B, n = 3), were depicted together with control data same as in Fig. 3. For other explanation, refer to Fig. 3.

로 의미 있게 항진됨을 보임, $P < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test).

포르말린 주사에 의한 척수 후각신경세포의 이상성 발화반응에 있어서 이차 발화 도중 척수 표면에 가해진 GABA 수용체 효현제 및 길항제가 미치는 영향

광동적범위 또는 고역치형 척수 후각신경세포의 신경활동을 대상으로, 포르말린 주사에 의해 생성된 이차 발화 도중 척수표면에 GABA 수용체 효현제나 길항제를 적용하고 그 효과를 조사하였다. 먼저 GABA-A 수용체 효현제나 길항제를 적용한 후 그 효과를 보았다(Fig. 7). 효현제인 muscimol (0.3 μ g)의

처치는 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화를 통계적으로 의미 있게 억제하였다($P < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test). 한편 길항제인 bicuculline (0.3 μ g)의 처치는 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응에 영향을 미치지 않았다.

다음 GABA-B 수용체 효현제나 길항제를 적용한 후 그 효과를 보았다(Fig. 8). 효현제인 baclofen (0.3 μ g)의 처치는 대조군의 경우와 비교하여 적용한 직후 약간의 억제를 보였다. 한편, 길항제인 phaclofen (0.3 μ g)의 처치는 대조군의 경우와 비교하여 이차 발화반응에 영향을 미치지 않았다.

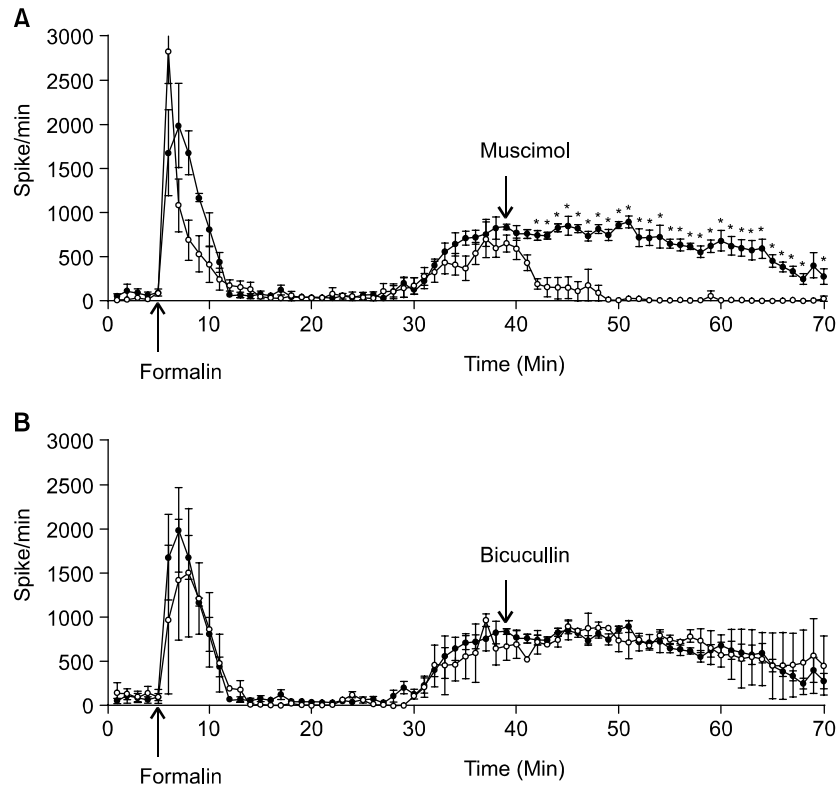


Fig. 7. Effects of GABA-A receptor agonist or antagonist treated during the second phase on the formalin-induced biphasic firing response. GABA-A receptor agonist muscimol (A) or GABA-A antagonist bicuculline (B) was applied ($0.3\mu\text{g}$ each) topically onto the surface of the spinal cord near the recording site during the second phase of firing. In each graph, experimental data (A, $n = 4$; B, $n = 2$), were depicted together with control data same as in Fig. 3. For other explanation, refer to Fig. 3.

고 찰

백서 뒷발에 가해진 포르말린 피하주사 후 요추부 후각 내 특정 부류의 신경세포에서 관찰된 두 차례에 걸친 신경발화는 기존의 행동학적 실험에서 포르말린 주사 후 관찰된 두 차례의 통증반응과 그 시간적 생성과정에 있어서 유사성을 보였다. 이런 독특한 발화양상은 말초로부터의 통각수용성 입력에만 반응하는 고역치(high threshold, HT)형 후각신경세포와 축삭 및 통각수용성 입력 모두에 반응하는 광동적범위(wide dynamic range, WDR)형 후각신경세포에서 관찰되었으며, 축삭수용성 입력에 최적으로 반응하는 저역치(low threshold, LT)형 후각신경세포에서는 관찰되지 않았다. 한편, 고역치형과 광동적범위형

척추후각신경세포는 통각정보를 척수에서 고위 중추로 전달하는데 관여한다고 알려져 있다. 따라서 이들 두 부류의 신경세포에서 포르말린에 의해 생성된 신경발화에 관한 연구는 포르말린 유도 통증의 특성 및 유발기전을 밝히는데 활용될 수 있다.

포르말린의 말초 피하주사 후 요추부후각 내 고역치형과 광동적범위형 신경세포에서 생성되는 일차 발화는 포르말린 주사 전에 요추부 표면에 가해진 AMPA 수용체 길항제에 의하여 억제되는 반면, NMDA와 mGlu 수용체 길항제에 의해서는 영향 받지 않았다. 이 결과는 일차 발화의 생성에는 후각세포에 존재하는 AMPA 수용체의 활성화가 기여하며 NMDA나 mGlu 수용체의 활성화는 이에 기여하지 않음을 의미한다. AMPA 수용체는 글루타민산에 의해 빠르게 활성화되는 이온 통로(fast-activating chan-

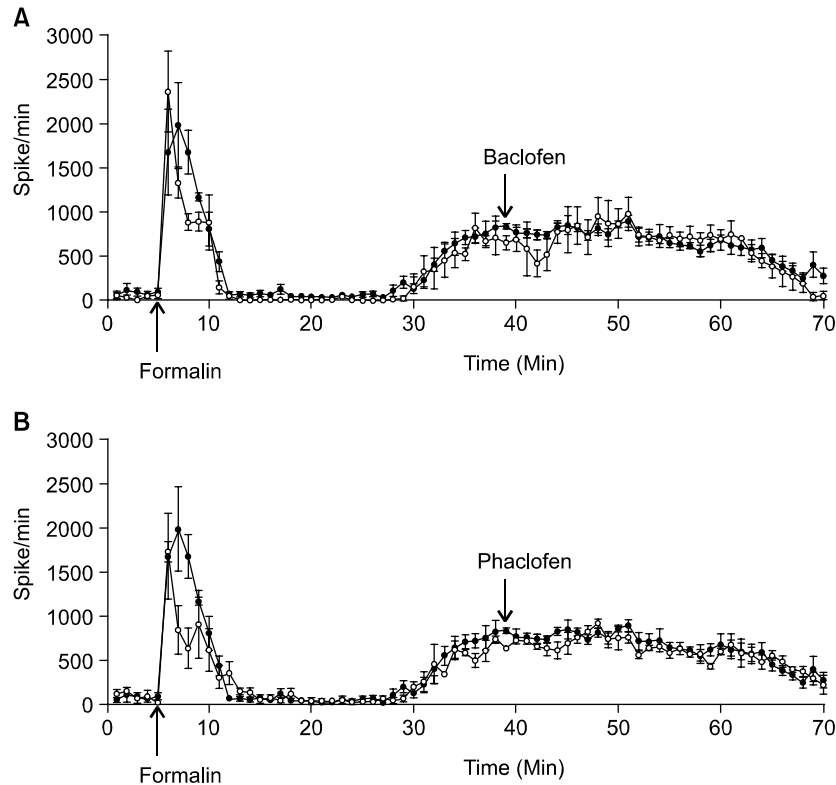


Fig. 8. Effects of GABA-B receptor agonist or antagonist treated during the second phase on the formalin-induced biphasic firing response. GABA-B receptor agonist baclofen (A, 0.3 μ g) or GABA-B antagonist phaclofen (B, 0.3 μ g) was applied topically onto the surface of the spinal cord near the recording site during the second phase of firing. In each graph, experimental data (A, n = 3; B, n = 3), were depicted together with control data same as in Fig. 3. For other explanation, refer to Fig. 3.

nel)로서, 이때 글루타민산은 포르말린 주입에 의해 흥분된 구심성 신경섬유의 척수 쪽 말단으로부터의 유리에 의해 제공된다. 따라서 일차 발화의 생성에는 포르말린에 의해 자극된 구심성신경섬유의 척수 내 신경말단에서 방출된 글루타민산에 의한 척수후각신경세포의 AMPA 수용체 활성화가 기여한다고 생각된다.

포르말린에 의한 일차 발화와 이차 발화 사이에 형성되는 중간기는 포르말린 주사 전에 척수에 가해진 GABA-A 및 GABA-B 수용체의 길항제에 의해 그 형성이 억제되었으며, 이들 길항제를 중간기 동안에 처치하면 처치 시점에서 이차 발화의 생성이 촉진되었다. 이는 중간기에서 관찰되는 후각신경세포의 발화 억제가 GABA의 작용에 의한 결과일 것임을 시사한다. GABA성 중간신경세포(interneuron)는

통각수용성 일차 구심섬유의 말단이 분포하는 척수 후각 근처에 많이 존재하고 있음은 이미 보고된 바 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 이러한 GABA성 중간신경세포로부터 포르말린 주입 후 수분 이내에 GABA의 분비가 초래되어 통각성 후각신경세포의 탈분극을 억제한다고 생각할 수 있다. GABA성 중간신경세포는 일차 구심섬유와의 직접적인 단일시냅스를 통해 활성화되거나 다중시냅스(multiple synapses) 경로를 통해 활성화될 수 있다. 직접적인 활성화에 관한 증거로서 작은 직경의 구심섬유가 척수 후각에서 GABA성 신경세포와 시냅스를 형성하고 있음이 관찰되었다.²⁰⁻²³⁾ 한편 다중시냅스를 통한 GABA성 신경세포의 활성화는 척수 내 분절(segment) 간을 연결해 주는 연결성 신경세포와 척수 상부에서 기시하여 척수로 하행하는 투사성 신경세포를 통해 이루어질 수 있다. 후자의

경우는 본 실험에 척수 절단 동물을 이용하였기에 배제할 수 있다. 그러나 척수가 절단되지 않은 동물에서는 포르말린 주사 후 관찰되는 중간기가 척수 절단 동물의 경우 보다 약 10여분 이상 길게 관찰되었는데, 이는 포르말린에 의한 조직 손상의 신호가 척수 상부에서 하행하는 투사성 신경세포를 추가적으로 활성화시켰기 때문으로 생각할 수 있다.

포르말린 주사에 의해 생성되는 이차 발화는 그 유도에 있어서 AMPA 수용체의 활성화에는 상관없이 NMDA 및 mGlu 수용체의 활성화에 의존적임을 본 연구결과는 보여준다. 즉 포르말린 주사에 의한 이차 발화는 주사 이전에 AMPA 수용체 길항제를 가할 시는 영향 받지 않았으나, NMDA 및 mGlu 수용체 길항제를 가할 시는 억제되었다. 이전 연구에 따르면, 포르말린 주사에 의해 생성되는 이차 발화는 신경세포의 민감화에 따른 것으로 알려져 있는데,²⁴⁾ 이러한 민감화는 NMDA 수용체의 이온통로 내 Mg^{2+} 의 제거와 이에 따른 세포 내로 다량의 칼슘 유입에 의존하는 것으로 알려졌다.^{25,26)} 본 실험 결과는 이차 발화의 유도가 NMDA 수용체 뿐 아니라 mGlu 수용체의 활성화를 통하여서도 이루어짐을 보였는데, 이는 포르말린 주사 시 척수후각 신경세포에서는 NMDA 수용체에 의존적으로 민감화가 형성됨과 더불어 mGlu 수용체의 활성화를 통한 세포 내 단백질의 인산화 과정이 이루어질 것임을 시사해 준다.²⁷⁾ 한편 AMPA 수용체 길항제의 전처치 시 일차 발화 빈도의 감소에도 불구하고 이차 발화에는 영향을 미치지 않았는데, 이는 포르말린 주사에 의해 일차 구심성신경섬유 말단에서 글루타민산 이외에 분비되는 substance-P나 CGRP와 같은 신경펩타이드의 작용에 의한 것으로 생각할 수 있다.^{28,29)} 즉 AMPA 수용체가 차단되었을 경우, 통각수용성 신경섬유에서 분비된 신경 펩타이드가 후각신경세포의 탈분극을 유도함으로써 NMDA 및 mGlu 수용체에 의한 중추성 민감화 및 세포 단백질의 인산화가 촉발되고 그 결과 이차 발화가 유도된 것이다.

한편 포르말린 주사에 의한 이차 발화의 유도에는 앞서 언급한 NMDA 및 mGlu 수용체의 활성화 뿐만 아니라 중간기 때 흥분되었던 억제성 GABA 신경의 흥분성 소멸이 함께 공헌함을 본 실험결과는 보여준다. 즉 포르말린 주사에 의해 생성되는 이차 발화 도중에 척수에 가해진 GABA-A 및 GABA-B 수

용체 길항제는 생성되는 발화에 영향을 미치지 않았다. 이는 길항제 처리 시점에서 GABA의 분비가 더 이상 이루어지지 않고 있음을 시사하는데, 그 이유는 길항제 처리가 발화를 더욱 항진시키지 않았기 때문이다. 또한 이차 발화 도중에 척수에 가해진 GABA-A 및 GABA-B 수용체 효현제는 정도에 차이는 있었지만 모두 발화를 억제하는 경향을 보였는데, 이 결과는 효현제 처리 시점에서 GABA 수용체가 비활성화 되었기 때문이 아니라 GABA 분비가 중지되었기 때문일 것임을 더욱 확고히 해 준다. 따라서 이들 결과는 GABA성 중간신경세포로부터의 GABA 분비는 이차 발화 시점에서 중지 되어 후각 신경세포에서의 이차 발화를 유도하는데 공헌할 것임을 시사한다.

포르말린 주사에 의해 생성되는 이차 발화는 그 유도에 있어서 유도의 경우와는 다르게 NMDA, AMPA, mGlu 수용체 모두의 활성화가 공헌함을 본 실험결과는 보여준다. 포르말린 주사에 의해 생성된 이차 발화가 유지되는 중간에 척수에 가해진 NMDA, AMPA, mGlu 수용체 모두에 의하여 발화가 억제되었다. 최근 연구에서 포르말린 주사에 의한 이차 반응 동안에는 말초로부터 구심성 체감각 입력이 지속됨을 보고 하였는데,³⁰⁻³³⁾ 이는 포르말린이 주사 부위에서 지속적으로 국소적인 염증 반응을 유도하기 때문으로 설명하였다. 따라서 이차 발화의 유지에는 염증반응으로 인해 일차구심섬유 말단으로부터 지속해서 분비되는 글루타민산의 작용에 의한 NMDA, AMPA, mGlu 수용체 모두의 활성화가 기여할 것임을 추측할 수 있다.

결 론

본 연구결과에 기초하여 포르말린 피하주사에 의해 후각신경세포에서 생성되는 신경발화의 유발 기전을 다음과 같이 설명할 수 있었다. 즉 1) 포르말린 피하주사에 의해 생성되는 요추부 내 통각정보전달 신경세포의 일차 발화는 일차구심성 섬유 말단에서 분비된 글루타민산의 작용에 의한 AMPA 수용체의 빠른 활성을 통해 생성되며, 2) 뒤 이은 억제성 GABA 신경의 흥분과 그 결과 분비된 GABA의 작용에 의한 GABA-A 및 GABA-B 수용체 활성화를 통한 발화억제가 중간기를 형성하고, 3) 이차 발화는 그 유도에

있어서 중간기 때 흥분되었던 GABA 신경의 흥분성 소멸과 이에 더불어 글루타민산에 의한 NMDA 및 mGlu 수용체의 활성화가 관여하며 그 유지에 있어서는 글루타민산의 작용에 의한 NMDA, AMPA, mGlu 수용체 모두의 활성화가 관여할 것이다.

참 고 문 헌

1. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A: The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40: 229-38.
2. Saddi GM, Abbott FV: Formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. *Pain* 2000; 89: 53-63.
3. Aloisi AM, Albonetti ME, Carli G: Behavioral effects of different intensities of formalin pain in rats. *Physiol Behav* 1995; 58: 603-10.
4. Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF: The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995; 60: 91-102.
5. Hunskaar S, Hole K: The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-14.
6. Hunter JC, Singh L: Role of excitatory amino acid receptors in the mediation of the nociceptive response to formalin in the rat. *Neurosci Lett* 1994; 174: 217-21.
7. Vaccarino AL, Marek P, Kest B, Weber E, Keana JFW, Liebeskind JC: NMDA receptor antagonists, MK-801 and ACEA-1011, prevent the development of tonic pain following subcutaneous formalin. *Brain Res* 1993; 615: 331-34.
8. Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM,Coderre TJ: Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* 1999; 82: 57-63.
9. Dickenson AH: Balance between excitatory and inhibitory events in the spinal cord and chronic pain. *Prog Brain Res* 1996; 110: 225-30.
10. Maxwell DJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J: Synaptic organization of excitatory and inhibitory boutons associated with spinal neurons which project through the dorsal columns of the cat. *Brain Res* 1995; 676: 103-12.
11. Staley KJ, Mody I: Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol* 1992; 68: 197-212.
12. Tomasulo RA, Ramirez JJ, Steward O: Synaptic inhibition regulates associative interactions between afferents during the induction of long-term potentiation and depression. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11578-82.
13. Yasui M, Kawasaki K, Matsushita A, Satoh M: Benzodiazepine inverse agonists augment long-term potentiation in CA1 and CA3 of guinea pig hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1993; 32: 127-31.
14. McGowan MK, Hammond DL: Antinociception produced by microinjection of L-glutamate into the ventromedial medulla of the rat: mediation by spinal GABAA receptors. *Brain Res* 1993; 620: 86-96.
15. Gilbert AK, Franklin KBJ: GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM): dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain* 2001; 90: 25-36.
16. Coggeshall RE, Carlton SM: Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Rev* 1997; 24: 28-66.
17. Andrew JT, Valerie L: GABA-like immunoreactivity in type 1 glomeruli of rat substantia gelatinosa. *Brain Res* 1990; 514: 171-74.
18. Magoul R, Onteniente B, Geffard M, Calas A: Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord: an immunohistochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 1987; 20: 1001-9.
19. Todd AJ, McKenzie J: GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 1989; 31: 799-806.
20. Yoshimura M, Nishi S: Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 1995; 482: 29-38.
21. Tao YX, Li YQ, Zhao AW, Johns RA: Synaptic relationship of the neurons containing a metabotropic glutamate receptors, mGluR5, with nociceptive primary afferent and GABAergic terminals in rat spinal superficial laminae. *Brain Res* 2000; 875: 138-43.
22. Carlton SM, Hayes ES: Light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 1990; 300: 162-82.
23. Hayes ES, Carlton SM: Primary afferent interactions: analysis of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive terminals in contact with unlabeled and

- GABA-immunoreactive profiles in the monkey dorsal horn. *Neuroscience* 1992; 47: 873-96.
 - 24.Coderre TJ, Melzack R: The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 1992; 12: 3671-5.
 - 25.Li J, Simone DA, Larson AA: Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 1999; 79: 75-82.
 - 26.Baranauskas G, Nistri A: Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 349-65.
 - 27.Woolf CJ: Excitatory amino acids increase glycogen phosphorylase activity in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1987; 73: 209-14.
 - 28.Chapman V, Buritova J, Honore P, Beson JM: Physiological contribution of neurokinin 1 receptor activation, and interaction with NMDA receptors, to inflammatory-evoked spinal c-fos expression. *J Neurophysiol* 1996; 76: 1817-27.
 - 29.Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA: Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* 2002; 22: 9086-98.
 - 30.Dallel R, Raboisson P, Clavelou P, Saade M, Woda A: Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain* 1995; 61: 11-6.
 - 31.McCall WD, Tanner KD, Levine JD: Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 1996; 208: 45-8.
 - 32.Damas J, Liegeois JF: The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359: 220-7.
 - 33.Pitcher GM, Henry JL: Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1509-15.
-